Instructions for Use of LabChip® Devices

325-Test Kit

ENGLISH

Bacterial Barcodes, Inc.
BBCI Catalog Number: DL-CK25
bioMérieux REF 270670

Not For Diagnostic Use.

Materials supplied in the kit

DNA Chip Reagents and Supplies Storage Range: +2 to +8° C

Cap Color	Name	Volume
Yellow	DNA Ladder	30 µL
Green	DNA Marker (150bp and 7,000bp)	2.0 mL
Blue	DNA Dye Concentrate	75 µL
Red	DNA Gel Matrix	1.4 mL
	6 Spin Filters	

DNA Chips Storage Range: +18 to +30° C

25 LabChip® Devices
2 Electrode Cleaning Chips
2 Syringes

Additional materials required, but not supplied

- DiversiLab™ System: Agilent® 2100 Bioanalyzer (Includes Chip Priming Station, Vortex Mixer and Timer)
- Powder-free gloves, lab coat and eye protection
- Pipettes: 0.1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, multi-channel or repeater pipette (optional)
- Aerosol resistant barrier pipette tips: 0.1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL
- Microcentrifuge tubes, 1.5 mL
- Microcentrifuge, variable speed
- Deionized water

Intended use

The LabChip® device kits contain the DNA chips (manufactured by Caliper®), and DNA Chip Reagents and Supplies needed for automated DNA fragment separation and detection using the DiversiLab System.

Introduction

Amplification of microbial genomic DNA using DiversiLab Fingerprinting kits generates a characteristic DNA pattern comprised of DNA fragments ranging in size from 200bp to over 2,000bp. The Agilent® 2100 Bioanalyzer uses microfluidic LabChip® technology to integrate the individual steps of traditional electrophoresis into a single automated process. DNA samples are separated within micro-channels of the DNA chip. As the separated DNA fragments pass through a laser beam, a DNA fingerprint is generated in the form of an electropherogram. Fingerprints from various samples are compared using the DiversiLab Software.

Principle of the DiversiLab System

The major steps involved in generating rep-PCR DNA fingerprints are as follows:

- Extract DNA from purified microbial cultures.
- Log sample information into the DiversiLab software.
- Perform rep-PCR amplification in a thermal cycler.
- Separate the DNA fragments using the Agilent® 2100 Bioanalyzer.
- Compare fingerprints using the statistical analysis feature of the DiversiLab software.

This document provides the specific procedure associated with separation of DNA and analysis of results. Refer also to the DiversiLab Software User's Guide and the DiversiLab fingerprinting kit insert.

Instructions for use

- This kit supplies sufficient reagents for the number of tests indicated.
- Do not use the components of this kit beyond the expiration date printed on the box.

Test limitations

- The results obtained from using the DiversiLab™ kit may not be useful or reliable if the provided protocol is not followed exactly, or if the results are applied in a manner for which they were not intended.
- This product is not for diagnostic use and the results of this test should not be used to diagnose disease, or to cure, mitigate, treat, or prevent disease in a patient.

Precautions

- The DNA Dye Concentrate contains DMSO. Please see MSDS for precautions pertaining to DMSO.
- S24/25: Avoid contact with skin and eyes.

Separation and analysis of samples

Please refer to the appropriate kit insert for procedures relating to rep-PCR setup and performance.

Step 3 (continued from rep-PCR kit)**: Separate amplified DNA**

■ Prepare the Gel-Dye Mix

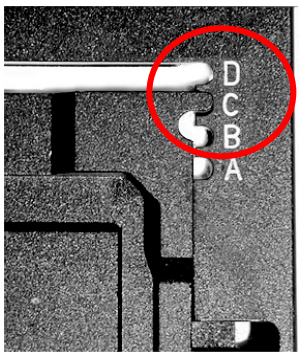
1. Allow contents of the DiversiLab DNA Chip Reagents and Supplies box to warm to room temperature for **at least** 30 minutes. Turn on the power to the Bioanalyzer at least 30 minutes before use.
   - Keep the lid of the reagent box closed during the warm-up time to prevent exposure of the dye to light.
2. Vortex the DNA Gel Matrix and DNA Dye Concentrate. Briefly spin down.
3. In a 1.5 mL microcentrifuge tube, add **200 µL** of DNA Gel Matrix (red cap) and **10 µL** of DNA Dye Concentrate (blue cap).

   Note: The DNA Gel Matrix is viscous. Pipette slowly to ensure appropriate transfer of volume.
4. Briefly vortex (5-10 seconds) the tube until the solution is homogeneous.
5. Transfer the solution to a provided spin filter. Centrifuge at 1,500 x g for 10 minutes at room temperature. There should be sufficient gel-dye mix for 7 preps. Write the date on the gel-dye mix tube. The gel-dye mix is good for 4 weeks, if stored at 4°C and protected from light.

Note: Protect the dye concentrate and the gel-dye mix from light. Exposure to light may result in degradation of the dye.

■ Load the chip

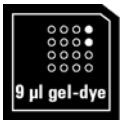
1. Allow contents of the DNA Chip Reagents and Supplies box to warm to room temperature for at least 30 minutes. Briefly vortex and spin down the DNA marker and ladder. Failure to mix reagents sufficiently may result in test failure. Do not vortex the gel-dye mix.
2. Unwrap a new DNA chip and inspect the back for fingerprints or defects. **DO NOT** touch the glass lens with bare hands or gloves. If prints are noted, gently wipe with lens paper.
3. Referring to the chip worksheet, write the assigned chip number on the chip label.
4. Place the DNA chip in the chip priming station with the base plate in **position C**. The syringe should be tightly attached and the syringe clip in the **topmost position**. Adjust the syringe plunger to 1.0 mL.



5. Pipette **9 µL** of gel-dye mix, using reverse pipetting technique, into the chip priming well G. Remove any air bubbles with a clean pipette tip.

Note: To prevent air bubbles, always place the pipette tip on the bottom of the well when dispensing liquid into the chip.

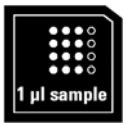
6. Lower the lid of the chip priming station and lock in place by pressing down on the silver tab. Depress the plunger to the syringe clip and allow the chip to pressurize for **exactly** 30 seconds.
7. After **exactly** 30 seconds, release the syringe clip. Allow the plunger to rise by its own pressure until movement ceases. Gently unlock the lid by lifting the silver tab and remove the DNA chip.
8. Inspect the back of the DNA chip for air bubbles in the channels (bubbles appear as lines). Note any channels that have bubbles. Continue loading chip; however, chip failure may occur if a bubble is present.
9. Pipette **9 µL** of gel-dye mix, using reverse pipetting technique, into the two waste wells G.



10. Pipette **5 µL** of well-mixed DNA Marker, using reverse pipetting technique, into the ladder well and each of the twelve sample wells.

Note: The DiversiLab *Mycobacterium* and *M. tuberculosis* kits come with a kit-specific marker. Use that marker only in wells containing amplicon derived from those kits to assure sufficient reagent.

11. Pipette **1 µL** of PCR product, using reverse pipetting technique, into each of the sample wells including the ladder well, following the well assignments on the chip worksheet.



Note: If less than 12 samples are loaded on a chip, pipette a duplicate sample into each of the unused wells.

12. Check the vortex with a leveling bubble. Place the chip securely into the vortex adapter and vortex for **exactly** 1 minute at 2200.
13. The chip must be loaded in the Bioanalyzer **within 5 minutes**.

■ Run the DNA chip in the Agilent® 2100 Bioanalyzer

Note: Make sure the Bioanalyzer has been turned on for **at least** 30 minutes before use.

Caution: Errors can be caused by mobile phone usage, bumping the Bioanalyzer, power surges, or placing the Bioanalyzer on a vibrating surface.

1. Before placing the DNA chip on the Bioanalyzer, start the Bioanalyzer software. Make sure the Bioanalyzer and computer are connected and communicating.
   - The image in the upper left corner on the PC will display a picture resembling the Bioanalyzer when communication is open. When the Bioanalyzer lid is opened, the image on display also appears to have an open lid.
2. Place the DNA chip on the Bioanalyzer and **gently** close the lid. The image on the display should now change from a Bioanalyzer to a red DiversiLab chip. Select **DiversiLab System V1.4** from the **Assay** menu.

Caution: The lid for the Agilent® 2100 Bioanalyzer **DOES NOT** have a locking mechanism. The lid must not be opened during analysis. Opening the lid during analysis will terminate the test. **DO NOT** place anything on the Bioanalyzer at any time. Pressure on the lid may result in damage to the electrodes.

3. In the File Prefix window, type the chip number from the chip label.

   Note: The correct chip number must be entered in the File Prefix field to be associated with the correct sample information in the DiversiLab™ software. The **Run Sample** must be set at 1 to 12.

4. Click **Start**. Approximately 1 hour is needed to complete the chip run.
5. After completion, the data is transferred automatically from the Bioanalyzer's PC to the DiversiLab software, where it can be analyzed from any Internet-connected PC.
6. Open the lid of the Bioanalyzer and remove the DNA chip. Dispose of the DNA chip in an appropriate biohazardous waste container.
7. Clean the Bioanalyzer electrodes at the end of each run. Slowly pipette **350 µL** of deionized water into one well of the Electrode Cleaner chip and place it in the Bioanalyzer. Close the lid and allow to soak for 10-15 seconds. Open the lid and remove the Cleaner chip. Allow the electrodes to dry for at least 10-15 seconds before loading the next DNA chip.

Step 4: Analyze results

Log in to the DiversiLab software from any Internet-connected PC. Refer to the DiversiLab Software User's Guide for details on the QC procedure and on creating and viewing reports.

Procedure Notes

Possible sources of error:

- For proper chip pressurization, it is important that the syringe is securely attached to the chip priming station and pressure be applied for exactly 30 seconds.
- For proper normalization and sizing of the gel image, it is extremely important that the ladder and the DNA marker be well mixed before each use. The DNA markers of 150bp and 7,000bp allow for normalization of each fingerprint. The molecular weight ladder may be used for estimation of the size of the fragments.

Maintenance:

- Before each use, inspect the syringe and plunger for cracks. Replace the syringe if any defects are noted.
- Rinse the electrodes in deionized water using the Electrode Cleaning Chip after each run.
- Brush the electrodes with deionized water and a soft-bristled brush every three months.
- Periodically wipe the exterior surfaces of the Bioanalyzer to prevent build up of dust. Use compressed air to remove dust from the chip reading area.
- Avoid touching the glass lens.

Contact information

Bacterial Barcodes, Inc.
425 River Road
Athens, GA 30602 USA

www.biomerieux.com

For technical assistance in the USA, contact bioMérieux Customer Service at 1-800-682-2666. Outside the USA, contact your local bioMérieux Representative.

Agilent is a registered trademark of Agilent Technologies, Inc.
bioMérieux, the blue logo, and DiversiLab are used, pending and/or registered trademarks belonging to bioMérieux SA or one of its subsidiaries.
Caliper and LabChip are registered trademarks of Caliper Life Sciences in the United States and/or other countries.

November 2008

Instructions for Use of LabChip® Devices

diversilab™ Strain typing

Bacterial Barcodes, Inc.
Referencia de BBCI: DL-CK25
bioMérieux REF 270670

Envase para 325 pruebas
ESPAÑOL

No destinado al uso diagnóstico.

Materiales suministrados en el envase

Reactivos y suministros para los chips de DNA Temperatura de almacenamiento: +2 a +8°C

Color de la tapa	Nombre	Volumen
Amarillo	DNA Ladder	30 µl
Verde	DNA Marker (150 bp y 7.000 bp)	2,0 ml
Azul	DNA Dye Concentrate	75 µl
Rojo	DNA Gel Matrix	1,4 ml
	6 filtros giratorios	

Chips de DNA Temperatura de almacenamiento: +18 a +30°C

25 dispositivos LabChip®
2 chips para limpieza de electrodos
2 jeringas

Materiales adicionales necesarios pero no suministrados

- Sistema DiversiLab™: Agilent® 2100 Bioanalyzer (incluye la estación de cebado de chips, mezclador vórtex y cronómetro)
- Guantes sin talco, batas de laboratorio y protección ocular
- Pipetas: Pipeta de 0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, multicanal o de repetición (opcional)
- Puntas de pipeta con barrera resistente a aerosoles: 0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl
- Tubos para microcentrífuga, 1,5 ml
- Microcentrífuga, velocidad variable
- Agua desionizada

Uso previsto

Los envases del dispositivo LabChip® contienen los chips de DNA (fabricados por Caliper®), y los reactivos y suministros para los chips de DNA necesarios para la separación y detección automática de fragmentos de DNA utilizando el sistema DiversiLab.

Introducción

La amplificación del DNA genómico microbiano utilizando los envases para la determinación de identificación genética de DiversiLab genera un patrón característico de DNA compuesto de fragmentos de DNA cuyos tamaños van de 200 bp a más de 2.000 bp. El equipo Agilent® 2100 Bioanalyzer utiliza una tecnología de microfluidos LabChip® para integrar los pasos individuales de la electroforesis tradicional en un solo proceso automatizado. Las muestras de DNA se separan dentro de los microcanales del chip de DNA. A medida que los fragmentos separados de DNA atraviesan un haz láser, se genera una identificación genética de DNA en la forma de un electroferograma. Se comparan la identificación genética proveniente de diversas muestras utilizando el software DiversiLab.

Principio del sistema DiversiLab

Los pasos principales involucrados en generar la identificación genética de DNA rep-PCR son los siguientes:

- Extraer el DNA de cultivos microbianos purificados.
- Registrar la información de las muestras en el software DiversiLab.
- Realizar la amplificación de rep-PCR en un termociclador.
- Separar los fragmentos de DNA utilizando el equipo Agilent® 2100 Bioanalyzer.
- Comparar la identificación genética utilizando la función de análisis estadístico del software DiversiLab.

Este documento proporciona el procedimiento específico asociado con la separación del DNA y el análisis de los resultados. Consulte también la guía del usuario del software DiversiLab y el prospecto del envase para la determinación de identificación genética de DiversiLab.

Instrucciones de uso

- Este envase suministra suficiente cantidad de reactivos para el número de pruebas indicados.
- No utilice los componentes de este envase después de la fecha de caducidad impresa en la caja.

Limitaciones de la prueba

- Los resultados obtenidos al utilizar el envase DiversiLab™ pueden no resultar útiles o fiables si el protocolo recomendado no se sigue al pie de la letra, o si los resultados se aplican de una manera para la cual no fueron destinados.
- Este producto no sirve para uso diagnóstico y los resultados de esta prueba no deben utilizarse para diagnosticar enfermedades, ni para curar, mitigar, tratar o prevenir enfermedades en un paciente.

Precauciones

- El DNA Dye Concentrate contiene DMSO. Consulte la hoja MSDS para conocer las precauciones referentes al DMSO.
- S24/25: Evítese el contacto con los ojos y la piel.

Separación y análisis de las muestras

Consulte el prospecto apropiado del envase para conocer procedimientos relacionados con la configuración y el rendimiento de rep-PCR.

Paso 3 (continuado del envase rep-PCR)**: Separar el DNA amplificado**

■ Prepare la mezcla Gel-Dye

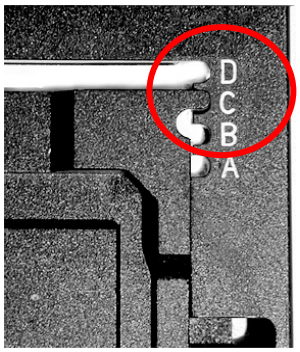
1. Deje que el contenido de la caja de reactivos y suministros para chips de DNA de DiversiLab se caliente hasta llegar a temperatura ambiente durante **al menos** 30 minutos. Encienda el suministro eléctrico al equipo Bioanalyzer al menos 30 minutos antes de usarlo.
   - Mantenga la tapa de la caja de reactivos cerrada durante el tiempo de calentamiento para evitar la exposición del colorante a la luz.
2. Agite en vórtex el DNA Gel Matrix y el DNA Dye Concentrate. Brevemente disminuya la velocidad de giro.
3. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, añada **200 µl** de DNA Gel Matrix (tapón rojo) y **10 µl** de DNA Dye Concentrate (tapón azul).

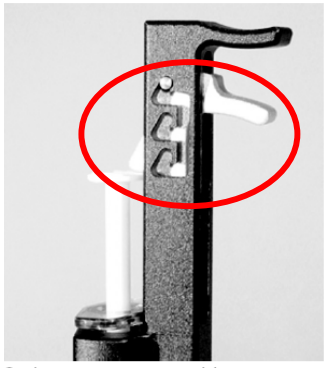
   Nota: El DNA Gel Matrix es viscoso. Pipetee lentamente para asegurar una apropiada transferencia de volumen.
4. Brevemente agite el tubo en el vórtex (5-10 segundos) hasta que la solución quede homogénea.
5. Transfiera la solución a un filtro giratorio provisto. Centrifugue a 1.500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Debe haber una cantidad suficiente de mezcla de gel con colorante para obtener 7 preparados. Escriba la fecha en el tubo de mezcla de gel con colorante. Dicha mezcla sirve durante 4 semanas si se la almacena a 4°C y se la protege de la luz.

Nota: Proteja el concentrado del colorante y la mezcla de gel con colorante de la luz. La exposición a la luz puede ocasionar la degradación del colorante.

■ Cargue el chip

1. Deje que el contenido de la caja de reactivos y suministros para chips de DNA se caliente hasta llegar a temperatura ambiente durante **al menos** 30 minutos. Brevemente agite el marcador y la cadena de DNA en el vórtex y disminuya la velocidad. Si no se mezclan los reactivos suficientemente, se podría obtener un fallo del análisis. No agite la mezcla de gel con colorante en el vórtex.
2. Desenvuelva un nuevo chip de DNA e inspeccione el dorso en busca de huellas digitales o defectos. **NO** toque la lente de vidrio con las manos desnudas ni con guantes. Si se observan huellas digitales, limpie delicadamente con papel para lentes.
3. Consulte la hoja de trabajo para el chip y anote el número de chip asignado en la etiqueta del chip.
4. Coloque el chip de DNA en la estación de cebado de chips con la placa base en la **posición C**. La jeringa debe conectarse firmemente y el gancho de la jeringa debe encontrarse en la **máxima posición superior**. Ajuste el émbolo de la jeringa en 1,0 ml.

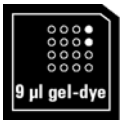




5. Pipetee **9 µl** de mezcla de gel con colorante, utilizando la técnica de pipeteo inverso, en el pocillo de cebado de chips G. Elimine cualquier burbuja de aire con una punta de pipeta limpia.

Nota: Para evitar burbujas de aire, siempre coloque la punta de la pipeta en el fondo del pocillo al dispensar líquido en el chip.

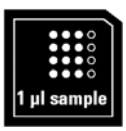
6. Baje la tapa de la estación de cebado de chips y bloquee en posición presionando la lengüeta plateada. Oprima el émbolo del gancho de la jeringa y permita que el chip se presurice durante **exactamente** 30 segundos.
7. Después de **exactamente** 30 segundos, suelte el gancho de la jeringa. Deje que el émbolo ascienda por su propia presión hasta que cese el movimiento. Delicadamente desbloquee la tapa levantando la lengüeta plateada, y retire el chip de DNA.
8. Inspeccione el dorso del chip de DNA en busca de burbujas de aire en los canales (las burbujas aparecen como líneas). Observe si hay canales que tienen burbujas. Continúe cargando el chip; sin embargo, puede ocurrir el fallo del chip en caso de haber una burbuja presente.
9. Pipetee **9 µl** de mezcla de gel con colorante, utilizando la técnica de pipeteo inverso, en los dos pocillos de desecho G.



10. Pipetee **5 µl** del DNA Marker mezclado en el pocillo, utilizando la técnica de pipeteo inverso, en el pocillo para cadenas y en cada uno de los doce pocillos para muestras.

Nota: Los envases *Mycobacterium* y *M. tuberculosis* de DiversiLab incluyen un marcador específico al envase. Utilice dicho marcador únicamente en los pocillos que contengan amplicón derivado de aquellos envases, para asegurar una cantidad suficiente de reactivo.

11. Pipetee **1 µl** del producto PCR, utilizando la técnica de pipeteo inverso, en cada uno de los pocillos para muestras, incluido el pocillo para cadenas, siguiendo las asignaciones de pocillos en la hoja de trabajo de chips.



Nota: Si se cargan menos de 12 muestras en un chip, pipetee una muestra duplicada en cada uno de los pocillos no utilizados.

12. Verifique el agitador vórtex con una burbuja de nivelación. Coloque el chip de manera segura en el adaptador del vórtex y agite en el vórtex durante **exactamente** 1 minuto a 2200.
13. El chip deberá cargarse en el equipo Bioanalyzer **en el lapso de 5 minutos**.

■ **Procese el chip de DNA en el equipo Agilent® 2100 Bioanalyzer**

Nota: Asegúrese de que el equipo Bioanalyzer haya estado encendido durante **al menos** 30 minutos antes de usarlo.

Precaución: Pueden producirse errores debido a la utilización de teléfonos celulares, al golpear el equipo Bioanalyzer, al haber sobretensiones momentáneas o al colocar el equipo Bioanalyzer sobre una superficie que vibra.

1. Antes de colocar el chip de DNA en el equipo Bioanalyzer, inicie el software Bioanalyzer. Asegúrese de que el equipo Bioanalyzer y el ordenador estén conectados y en comunicación.
   - La imagen en la esquina superior izquierda del PC mostrará una imagen que se asemeja al equipo Bioanalyzer una vez que esté abierta la comunicación. Cuando se abre la tapa del equipo Bioanalyzer, la imagen de la pantalla también parece tener una tapa abierta.
2. Coloque el chip de DNA en el equipo Bioanalyzer y cierre la tapa **suavemente**. La imagen en la pantalla ahora debería cambiar de un equipo Bioanalyzer a un chip DiversiLab de color rojo. Seleccione **DiversiLab System V1.4** del menú **Assay** (Ensayo).

   Precaución: La tapa del equipo Agilent® 2100 Bioanalyzer **NO** tiene un mecanismo de bloqueo. No debe abrirse la tapa durante el análisis. Abrir la tapa durante el análisis terminará el procedimiento. **NO** coloque nada sobre el equipo Bioanalyzer en ningún momento. Una presión en la tapa podría ocasionar daños a los electrodos.
3. En la ventana File Prefix (Prefijo del archivo), escriba el número de chip que aparece en la respectiva etiqueta.

   Nota: Es necesario introducir el número correcto de chip en el campo File Prefix (Prefijo del archivo) que se desee asociar con la información correcta de la muestra en el software DiversiLab™. **Run Sample** (Procesar muestra) debe establecerse en un valor entre 1 y 12.
4. Haga clic en **Start** (Comenzar). Se necesita aproximadamente 1 hora para completar el procesamiento del chip.
5. Una vez concluido el proceso, los datos se transfieren automáticamente del PC del equipo Bioanalyzer al software DiversiLab, donde podrá ser analizado desde cualquier PC conectado a Internet.
6. Abra la tapa del equipo Bioanalyzer y retire el chip de DNA. Deseche el chip de DNA en un recipiente apropiado para desechos con peligro biológico.
7. Limpie los electrodos del equipo Bioanalyzer al final de cada procesamiento. Lentamente pipetee **350 µl** de agua desionizada en un pocillo del chip limpiador de electrodos y colóquelo en el equipo Bioanalyzer. Cierre la tapa y permita remojar durante 10-15 segundos. Abra la tapa y retire el chip limpiador. Deje que los electrodos se sequen durante al menos 10-15 segundos antes de cargar el siguiente chip de DNA.

Paso 4: Analizar los resultados

Inicie una sesión en el software DiversiLab desde cualquier PC conectado a Internet. Consulte la guía del usuario del software DiversiLab para conocer detalles sobre el procedimiento de control de calidad y sobre cómo crear y visualizar informes.

Notas del procedimiento

Fuentes posibles de error:

- Para lograr una correcta presurización del chip, es importante que la jeringa esté firmemente conectada a la estación de cebado del chip y que se aplique presión durante exactamente 30 segundos.
- Para lograr una correcta normalización y dimensionamiento de la imagen de gel, es extremadamente importante que el marcador de DNA esté bien mezclado antes de cada uso. Los marcadores de DNA de 150 bp y 7.000 bp permiten la normalización de cada identificación genética. Puede utilizarse la cadena de peso molecular para estimar el tamaño de los fragmentos.

Mantenimiento:

- Antes de cada uso, inspeccione la jeringa y el émbolo en busca de grietas. Reemplace la jeringa en caso de observarse cualquier tipo de defecto.
- Enjuague los electrodos en agua desionizada utilizando el chip para limpieza de electrodos después de cada procesamiento.
- Cepille los electrodos con agua desionizada y un cepillo de cerdas suaves cada tres meses.
- Periódicamente limpie las superficies exteriores del equipo Bioanalyzer para evitar la acumulación de polvo. Utilice aire comprimido para eliminar el polvo del área de lectura de chips.
- Evite tocar la lente de vidrio.

Información de contacto

Bacterial Barcodes, Inc.
425 River Road
Athens, GA 30602 USA

www.biomerieux.com

Para obtener asistencia técnica en EE. UU., póngase en contacto con el Servicio técnico de bioMérieux llamando al 1-800-682-2666. Fuera de EE. UU., póngase en contacto con el representante local de bioMérieux.

Agilent es una marca registrada de Agilent Technologies, Inc.
bioMérieux, el logotipo azul y DiversiLab son marcas comerciales utilizadas, en trámite y/o registradas de bioMérieux SA o una de sus filiales.
Caliper y LabChip son marcas registradas de Caliper Life Sciences en Estados Unidos y otros países.

Noviembre de 2008

Instructions for Use of LabChip® Devices

Bacterial Barcodes, Inc.
Référence du catalogue BBCI : DL-CK25
bioMérieux REF 270670

Coffret pour 325 tests

FRANÇAIS

Ne peut être utilisé à des fins diagnostiques.

Matériaux fournis dans le kit

Fournitures et réactifs puce ADN Température de stockage : +2 à +8 °C

Couleur bouchon	Nom	Volume
Jaune	Échelle d'ADN	30 µL
Vert	Marqueur ADN (150 bp et 7 000 bp)	2,0 mL
Bleu	Concentré de colorant ADN	75 µL
Rouge	Matrice de gel ADN	1,4 mL
	6 tubes avec colonne de filtration	

Puces ADN Température de stockage : +18 à +30 °C

25 dispositifs LabChip®
2 puces de nettoyage d'électrodes
2 seringues

Autre matériel nécessaire, mais non fourni

- Système DiversiLab™ : Agilent® 2100 Bioanalyzer (inclut la station d'amorçage de puce, le mélangeur et le minuteur du vortex)
- Gants non talqués, blouse de laboratoire et lunettes de protection.
- Pipettes : 0,1-10 µL, 10-100 µL, 100-1 000 µL, multi-canaux ou à répétition (en option)
- Embouts de pipette avec filtre résistant aux aérosols : 0,1-10 µL, 10-100 µL, 100-1 000 µL
- Microtubes à centrifuger, 1,5 mL
- Microcentrifugeuse à vitesse variable
- Eau déminéralisée

Utilisation

Les kits de dispositifs LabChip® contiennent les puces ADN (fabriquées par Caliper®) ainsi que les fournitures et les réactifs puce ADN nécessaires pour la détection et la séparation automatiques des fragments d'ADN à l'aide du système DiversiLab.

Introduction

L'amplification de l'ADN génomique microbien à l'aide des kits d'empreintes d'ADN DiversiLab génère une séquence d'ADN caractéristique composée de fragments d'ADN dont la taille va de 200 bp à plus de 2 000 bp. L'Agilent® 2100 Bioanalyzer utilise la technologie LabChip® microfluidique pour intégrer chaque étape de l'électrophorèse traditionnelle dans un seul et unique processus automatisé. Les échantillons d'ADN sont séparés dans les microcanaux de la puce ADN. Lorsque les fragments d'ADN séparés passent devant un faisceau laser, une empreinte ADN est générée sous forme d'électrophérogramme. Les empreintes de différents échantillons sont comparées à l'aide du logiciel DiversiLab.

Principe du système DiversiLab

Les étapes principales impliquées dans la génération d'empreintes d'ADN rep-PCR sont les suivantes :

- Extraction de l'ADN à partir de cultures microbiennes purifiées.
- Saisie des informations concernant les échantillons dans le logiciel DiversiLab.
- Exécution d'une amplification rep-PCR dans un thermocycleur.
- Séparation des fragments d'ADN en utilisant l'Agilent® 2100 Bioanalyzer.
- Comparaison des empreintes en utilisant la fonction d'analyse statistique du logiciel DiversiLab.

Ce document décrit la procédure spécifique associée à la séparation de l'ADN et l'analyse des résultats. Se reporter au guide utilisateur du logiciel DiversiLab et aux fiches techniques des kits d'empreintes DiversiLab.

Mode d'emploi

- Ce kit fournit suffisamment de réactifs pour le nombre de tests indiqués.
- Ne pas utiliser les composants de ce kit au-delà de la date d'expiration indiquée sur la boîte.

Limites du test

- Les résultats obtenus avec l'utilisation d'un kit DiversiLab™ peuvent ne pas être utiles ou fiables si le protocole fourni n'est pas parfaitement suivi ou si l'application des résultats n'est pas telle que prévue.
- Ce produit n'est pas conçu pour une utilisation diagnostique et les résultats de ce test ne doivent pas être utilisés pour diagnostiquer une maladie, ou pour soigner, limiter, traiter ou empêcher une maladie chez un patient.

Précautions

- Le concentré de colorant ADN contient du diméthylsulfoxide. Pour prendre connaissance des précautions associées à l'utilisation du diméthylsulfoxide, consulter les fiches techniques de santé et de sécurité correspondantes.
- S24/25 : éviter tout contact avec la peau et les yeux.

Séparation et analyse des échantillons

Pour connaître les procédures liées à la préparation et à l'exécution d'une amplification rep-PCR, se reporter aux fiches techniques correspondantes.

Étape 3 (suite du kit rep-PCR) **: Séparation de l'ADN amplifié**

■ **Préparer le mélange gel/colorant**

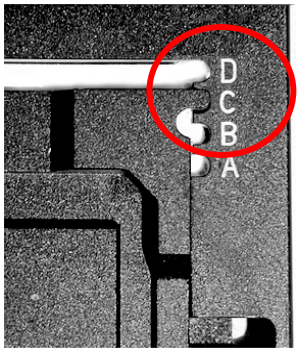
1. Laisser le contenu de la boîte de fournitures et de réactifs puce ADN DiversiLab parvenir à la température ambiante pendant **au moins** 30 minutes. Mettre le Bioanalyzer sous tension au moins 30 minutes avant son utilisation.
   - Maintenir le couvercle de la boîte des réactifs fermée pendant la période de réchauffement afin d'éviter l'exposition du colorant à la lumière.
2. Agiter au vortex la matrice de gel ADN et le concentré de colorant ADN. Ralentir brièvement la rotation.
3. Dans un microtube à centrifuger de 1,5 mL, ajouter **200 µL** de gel de matrice ADN (bouchon rouge) et **10 µL** de concentré de colorant ADN (bouchon bleu).

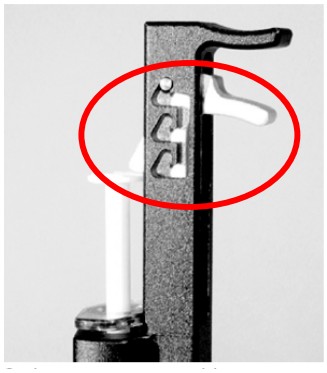
   Remarque : La matrice de gel ADN est visqueuse. Pipetter lentement afin dede transférer le volume attendu.
4. Agiter brièvement au vortex (5 à 10 secondes) le tube jusqu'à ce que la solution soit homogène.
5. Transférer la solution dans un tube avec colonne de filtration fourni. Centrifuger à 1 500 x g pendant 10 minutes à température ambiante. Le technicien devra obtenir un mélange gel/colorant suffisant pour 7 préparations. Inscrire la date sur le tube du mélange gel/colorant. Le mélange gel/colorant reste stable pendant 4 semaines, à condition qu'il soit stocké à 4 °C et qu'il ne soit pas exposé à la lumière.

Remarque : Éviter l'exposition du concentré de colorant et du mélange gel/colorant à la lumière, sous peine de dégrader le colorant.

■ **Charger la puce**

1. Laisser le contenu de la boîte de fournitures et de réactifs puce ADN parvenir à la température ambiante pendant au moins 30 minutes. Agiter brièvement au vortex et ralentir la rotation du marqueur et de l'échelle de l'ADN. Si les réactifs ne sont pas suffisamment bien mélangés, les tests risquent d'échouer. **Ne pas agiter au vortex le mélange gel/colorant**.
2. Déballer une nouvelle puce ADN et vérifier au dos qu'elle ne présente ni empreintes ni traces d'endommagement. **NE PAS** toucher la lentille de verre à mains nues ou avec des gants. Si des empreintes sont visibles, les nettoyer délicatement avec du papier pour lentilles.
3. En se référant à la fiche de la puce, inscrire le numéro attribué à la puce sur l'étiquette de cette dernière.
4. Placer la puce ADN dans la station d'amorçage de puce avec la plaque de base en **position C**. La seringue doit être fermement fixée et le clip de la seringue doit être placé à la **position la plus élevée**. Placer le piston de la seringue au niveau de 1,0 mL.

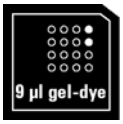




5. Pipetter **9 µL** du mélange gel/colorant, au moyen d'une **technique de pipetage inverse**, dans le puits d'amorçage de la puce G. Éliminer les bulles d'air avec un embout de pipette propre.

Remarque : Pour éviter la formation de bulles d'air, toujours placer l'embout de pipette au fond du puits lors de la distribution de liquide dans la puce.

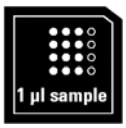
6. Abaisser le couvercle de la station d'amorçage de puce et le verrouiller en place en appuyant sur la languette argentée. Abaisser le piston en appuyant sur le clip de la seringue et laisser la puce sous pression pendant **exactement** 30 secondes.
7. Après **exactement** 30 secondes, relâcher le clip de la seringue. Laisser le piston remonter sous l'effet de sa propre pression jusqu'à ce qu'il s'immobilise. Déverrouiller délicatement le couvercle en soulevant la languette argentée et retirer la puce ADN.
8. Vérifier au dos de la puce ADN que les canaux ne contiennent pas de bulles d'air (les bulles apparaissent sous forme de lignes). Noter tout canal contenant des bulles. Poursuivre le chargement de la puce ; les tests risquent d'échouer si des bulles se forment.
9. Pipetter **9 µL** du mélange gel/colorant, au moyen d'une technique de pipetage inverse, dans les deux puits de rejet G.



10. Pipetter **5 µL** du marqueur ADN bien mélangé, au moyen d'une technique de pipetage inverse, dans le puits de l'échelle et chacun des 12 puits d'échantillons.

Remarque : Les kits *Mycobacterium* et *M. tuberculosis* de DiversiLab comprennent chacun un marqueur spécifique. N'utiliser ce marqueur que dans les puits contenant un amplicon dérivé de ces kits afin de garantir une quantité de réactif suffisante.

11. Pipetter **1 µL** de produit PCR, au moyen d'une technique de pipetage inverse, dans chacun des puits d'échantillon, y compris le puits de l'échelle, en suivant l'affectation des puits telle qu'elle est décrite dans la fiche de travail de la puce.



Remarque : Si moins de 12 échantillons sont chargés sur une puce, pipetter un échantillon en double dans chacun des puits non utilisés.

12. Vérifier le vortex avec un niveau à bulle. Placer la puce dans l'adaptateur du vortex et bien la stabiliser, puis l'agiter pendant **exactement** 1 minute à 2 200.
13. La puce doit être chargée dans le Bioanalyzer **dans les 5 minutes qui suivent**.

■ Traiter la puce ADN dans l'Agilent® 2100 Bioanalyzer

Remarque : Veiller à mettre le Bioanalyzer sous tension **au moins** 30 minutes avant son utilisation.

Attention : L'utilisation d'un téléphone portable, des coupures de courant, l'installation du Bioanalyzer sur une surface vibrante ou son exposition à des chocs peuvent entraîner des erreurs.

1. Avant de placer la puce ADN sur le Bioanalyzer, démarrer le logiciel Bioanalyzer. S'assurer que le Bioanalyzer et l'ordinateur sont connectés l'un à l'autre et communiquent ensemble.
   - Lorsque la communication entre les deux appareils est établie, une image ressemblant au Bioanalyzer apparaît dans l'angle supérieur gauche de l'ordinateur. Si le couvercle du Bioanalyzer est ouvert, l'image représente l'appareil avec le couvercle ouvert.
2. Placer la puce ADN sur le Bioanalyzer et fermer **délicatement** le couvercle. L'image du Bioanalyzer devrait à présent être remplacée par une puce DiversiLab rouge. Sélectionner **DiversiLab System V1.4** dans le menu **Assay** (Analyse).

   Attention : Le couvercle de l'Agilent® 2100 Bioanalyzer **N**'est **PAS** doté d'un mécanisme de verrouillage. Il ne doit pas être ouvert en cours d'analyse. Son ouverture pendant une analyse mettra fin au test. **NE** jamais **RIEN** placer sur le Bioanalyzer. Toute pression exercée sur le couvercle peut endommager les électrodes.

3. Dans la fenêtre File Prefix (Préfixe du fichier), taper le numéro de la puce indiqué sur l'étiquette.

   Remarque : Le numéro correct de puce doit être saisi dans le champ File Prefix (Préfixe du fichier) afin d'être associé aux informations correctes sur les échantillons dans le logiciel DiversiLab™. L'option **Run Sample** (Traiter l'échantillon) doit être renseignée par une valeur comprise entre 1 et 12.
4. Cliquer sur **Start** (Démarrer). 1 heure environ est nécessaire pour compléter le traitement de la puce.
5. À la fin du traitement, les données sont automatiquement transférées de l'ordinateur du Bioanalyzer au logiciel DiversiLab, où elles peuvent être analysées sur tout ordinateur connecté à Internet.
6. Ouvrir le couvercle du Bioanalyzer et retirer la puce ADN. Eliminer la puce ADN dans un conteneur approprié pour les déchets présentant un risque biologique.
7. Nettoyer les électrodes du Bioanalyzer à la fin de chaque traitement. Pipetter lentement **350 µL** d'eau déminéralisée dans un puits de la puce de nettoyage d'électrodes et placer cette dernière dans le Bioanalyzer. Fermer le couvercle et laisser tremper pendant 10 à 15 secondes. Ouvrir le couvercle et retirer la puce de nettoyage. Laisser les électrodes sécher pendant au moins 10 ou 15 secondes avant de charger la puce ADN suivante.

Étape 4 : Analyser les résultats

Se connecter au logiciel DiversiLab à partir de tout ordinateur connecté à Internet. Se reporter au guide utilisateur du logiciel DiversiLab pour plus d'informations sur la procédure de contrôle qualité et la création et l'affichage de rapports.

Remarques sur les procédures

Sources d'erreur possibles :

- Pour la bonne pressurisation des puces, il est important que la seringue soit bien fixée à la station d'amorçage de puce et qu'une pression soit exercée pendant 30 secondes exactement.
- Pour la normalisation et le dimensionnement appropriés de l'image du gel, il est extrêmement important que l'échelle et le marqueur d'ADN soient bien mélangés avant chaque utilisation. Les marqueurs d'ADN de 150 bp et 7 000 bp permettent la normalisation de chaque empreinte. L'échelle du poids moléculaire peut être utilisée pour estimer la taille des fragments.

Maintenance :

- Avant chaque utilisation, vérifier que la seringue et le piston ne présentent aucune fissure. Si le moindre défaut est observé, remplacer la seringue.
- Rincer les électrodes dans l'eau déminéralisée à l'aide de la puce de nettoyage d'électrodes après chaque traitement.
- Tous les trois mois, brosser les électrodes avec une brosse à poils souples et de l'eau déminéralisée.
- Nettoyer régulièrement les surfaces extérieures du Bioanalyzer afin d'éviter l'accumulation de poussière. Éliminer la poussière de la zone de lecture de la puce avec de l'air comprimé.
- Éviter de toucher la lentille de verre.

Coordonnées des contacts

Bacterial Barcodes, Inc.
425 River Road
Athens, GA 30602 USA

www.biomerieux.com

Pour toute assistance technique aux États-Unis, contacter le Service clientèle de bioMérieux au 1-800-682-2666. En dehors des États-Unis, contacter un représentant local de bioMérieux.

Agilent est une marque déposée d'Agilent Technologies, Inc.
bioMérieux, le logo bleu et DiversiLab sont des marques utilisées, en attente d'homologation et/ou déposées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.
Caliper et LabChip sont des marques déposées de Caliper Life Sciences aux États-Unis et/ou dans d'autres pays.

Novembre 2008

Instructions for Use of LabChip® Devices

Kit di 325 test

ITALIANO

Bacterial Barcodes, Inc.
Numero catalogo BBCI: DL-CK25
bioMérieux REF 270670

Non per uso diagnostico

Materiali forniti nel kit

Reagenti e forniture DNA chip Condizioni di conservazione: da +2 a +8°C

Colore tappo	Nome	Volume
Giallo	DNA Ladder	30 µl
Verde	DNA Marker (150bp e 7000bp)	2,0 ml
Blu	Colorante DNA concentrato	75 µl
Rosso	Matrice gel DNA	1,4 ml
	6 filtri da centrifuga	

DNA chip Condizioni di conservazione: da +18 a +30°C

25 dispositivi LabChip®
2 chip pulizia elettrodi
2 siringhe

Altri materiali necessari ma non forniti

- Sistema DiversiLab™: Agilent® 2100 Bioanalyzer (Include base di preparazione chip, mixer Vortex e timer)
- Guanti senza talco, camice da laboratorio e protezione per gli occhi
- Pipette: da 0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, multicanale o pipette ripetitrici (opzionali)
- Puntali per pipette anti-aerosol: da 0,1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl
- Provette per microcentrifuga, 1,5 ml
- Microcentrifuga a velocità variabile
- Acqua deionizzata

Uso previsto

I kit del dispositivo LabChip® includono DNA chip (prodotti dai Caliper®) e i reagenti e le forniture DNA necessarie per la separazione e l'identificazion e automatizzata dei frammenti di DNA con il sistema DiversiLab.

Introduzione

L'amplificazione del DNA microbico genomico con l'utilizzo dei kit DiversiLab Fingerprinting genera un pattern di DNA caratterstico formato da frammenti di DNA di dimensioni comprese tra 200bp e oltre 2000bp. Agilent® 2100 Bioanalyzer utilizza la tecnologia microfluidica LabChip® per integrare in un singolo processo automatizzato le operazioni richieste dall'elettroforesi tradizionale. I campioni di DNA sono separati nei microcanali del chip DNA. Al passaggio di un raggio laser sui frammenti separati di DNA, viene generato un fingerprint del DNA, sotto forma di elettroferogramma. La comparazione di fingerprint di diversi campioni viene poi effettuata utilizzando il software DiversiLab.

Principi del sistema Diversilab

Di seguito sono riportati i principali step eseguiti per generare il fingerprint del DNA con rep-PCR.

- Estrazione del DNA da colture microbiche purificate.
- Registrazione delle informazioni del campione nel software DiversiLab.
- Esecuzione dell'amplificazione rep-PCR in un termociclatore.
- Separazione dei frammenti di DNA utilizzando Agilent® 2100 Bioanalyzer.
- Confronto dei fingerprint utilizzando la funzione di analisi statistica del software DiversiLab.

Il presente documento fornisce la procedura specifica da utilizzare per la separazione del DNA e per l'analisi dei risultati. Consultare inoltre la Guida utente del software DiversiLab e il foglio di istruzioni del kit fingerprinting DiversiLab.

Istruzioni per l'uso

- Il kit fornisce una quantità di reagenti sufficiente per il numero di test indicati.

- Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza stampata sulla confezione.

Limitazioni del test

- I risultati ottenuti con l'uso del kit DiversiLab™ potrebbero non essere utili o affidabili se non si segue alla lettera il protocollo fornito o se i risultati sono applicati in maniera non corretta.
- Il prodotto non è inteso per uso diagnostico. Non utilizzare i risultati dei test per diagnosticare patologie o per curare, alleviare, trattare o prevenire patologie nei pazienti.

Precauzioni

- Il colorante DNA concentrato contiene DMSO. Vedere MSDS per le precauzioni relative a DMSO.
- S24/25: Evitare il contatto con la pelle e con gli occhi.

Separazione e analisi dei campioni

Consultare il foglio di istruzioni del kit per conoscere le procedure relative alla preparazione e all'esecuzione della rep-PCR.

Operazione 3 (continua dalle istruzioni relative al kit rep-PCR)**: separazione del DNA amplificato**

■ Preparazione della miscela gel-colorante

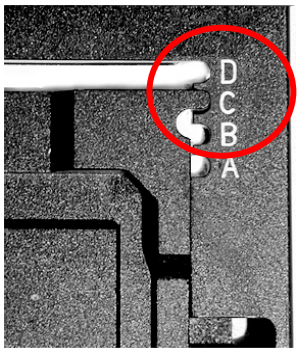
1. Consentire per **almeno** 30 minuti al materiale incluso nella confezione dei reagenti e delle forniture DiversiLab DNA chip di raggiungere la temperatura ambiente. Avviare il Bioanalyzer almeno 30 minuti prima dell'utilizzo.
   - Tenere chiuso il coperchio della scatola dei reagenti nella fase di riscaldamento, in modo da prevenire l'esposizione alla luce della tintura.
2. Agitare sul vortex la matrice gel DNA ed il colorante DNA concentrato. Far girare brevemente verso il basso.
3. Aggiungere **200 µl** di gel matrice DNA (tappo rosso) e **10 µl** di colorante DNA concentrato (tappo blu) in una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml.

   Nota: la matrice gel DNA è una sostanza viscosa. Pipettare lentamente in modo da effettuare un trasferimento di volume appropriato.
4. Agitare brevemente sul vortex (5-10 secondi) la provetta finché la soluzione diviene omogenea.
5. Trasferire la soluzione in uno dei filtri di centrifuga inclusi nella confezione. Centrifugare a 1.500 x g per 10 minuti a temperatura ambiente. La miscela gel-colornate ottenuta dovrebbe essere sufficiente per 7 preparazioni. Scrivere la data sulla provetta della miscela gel-colorante. La miscela gel-colorante si conserva per 4 settimane se conservata a 4°C, al riparo dalla luce.

Nota: proteggere concentratali colorante concentrato e la miscela gel-colorante dalla luce. L'esposizione alla luce potrebbe causare la degradazione del colorante.

■ Caricamento del chip

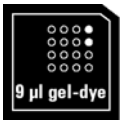
1. Consentire per almeno 30 minuti al materiale incluso nella confezione dei reagenti e delle forniture DNA chip di raggiungere la temperatura ambiente. Agitare brevemente sul vortex e far girare verso il basso il DNA marker e il ladder. Una miscelatura insufficiente dei reagenti potrebbe impedire lo svolgimento del test. Non agitare sul vortex la miscela gel-colorante.
2. Togliere dall'involucro un nuovo DNA chip e verificare che sul retro non vi siano impronte o difetti. **NON** toccare la lente in vetro a mani nude o con guanti. Se si notano impronte, rimuoverle delicatamente con una cartina per lenti.
3. Facendo riferimento al foglio di lavoro del chip, scrivere sull'etichetta il numero assegnato.
4. Collocare il DNA chip sulla base per il priming dei chip, con la piastra di base in **posizione C**. La siringa deve essere attaccata saldamente e il fermo della siringa deve trovarsi alla **massima altezza**. Adattare lo stantuffo della siringa a 1,0 ml.



5. Pipettare **9 µl** di miscela gel-colorante, utilizzando il metodo inverso, nel pozzetto per il priming dei chip G. Togliere le bolle d'aria con un puntale per pipette pulito.

Nota: è possibile prevenire la formazione di bolle d'aria collocando il puntale della pipetta sul fondo del pozzetto quando del liquido è versato nei chip.

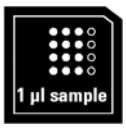
6. Abbassare il coperchio della base per il priming dei chip e chiudere premendo verso il basso l'aletta color argento. Abbassare lo stantuffo sul fermo della siringa e consentire la pressurizzazione del chip per 30 secondi **esatti**.
7. Trascorsi 30 secondi **esatti**, rilasciare il fermo della siringa. Consentire allo stantuffo di alzarsi grazie all'effetto della propria pressione finché non si ferma. Aprire delicatamente il coperchio alzando l'aletta color argento e togliere il DNA chip.
8. Controllare il retro del DNA chip per verificare la presenza di bolle d'aria nei canali (le bolle appaiono come linee). Annotare l'eventuale presenza di bolle in un canale. Continuare il caricamento; tuttavia, in presenza di bolle, il chip si potrebbe rovinare.
9. Pipettare **9 µl** della miscela gel-colorante, utilizzando il metodo inverso, nei due pozzetti degli scarti G.



10. Pipettare **5 µl** di DNA marker ben miscelato, utilizzando il metodo inverso, nel pozzetto del ladder e in ciascuno dei dodici pozzetti dei campioni.

Nota: i kit DiversiLab *Mycobacterium* e *M. tuberculosis* includono un marker specifico. Utilizzare esclusivamente tale marker in pozzetti contenenti amplicon derivato da tali kit, in modo da assicurare una quantità sufficiente di reagente.

11. Pipettare **1 µl** di prodotti di PCR, utilizzando il metodo inverso, in ciascuno dei pozzetti dei campioni, incluso il pozzetto del ladder, rispettando le assegnazioni previste sul foglio di lavoro del chip.



Nota: se sono stati caricati meno di 12 campioni su un chip, pipettare il duplicato di un campione in ciascuno dei pozzetti non utilizzati.

12. Verificare il vortex con una bolla di livellamento. Collocare saldamente il chip nell'adattatore del vortex per un minuto **esatto** a 2.200.
13. Il chip deve essere caricato sul Bioanalyzer **entro 5 minuti**.

■ Avviare il DNA chip in Agilent® 2100 Bioanalyzer

Nota: accertarsi che il Bioanalyzer sia stato acceso **almeno** 30 minuti prima dell'utilizzo.

Avvertenza: sono possibili cause di errore l'utilizzo di telefoni cellulari, urti del Bioanalyzer, sovratensioni o il collocamento su superfici vibranti.

1. Avviare il software del Bioanalyzer prima di collocare il DNA chip su di esso. Verificare che il Bioanalyzer e il computer siano connessi e possano comunicare.
   - All'avvio della comunicazione verrà mostrata nell'angolo superiore sinistro del PC un'immagine raffigurante il Bioanalyzer. L'apertura del coperchio del Bioanalyzer sarà raffigurata nell'immagine sullo schermo.
2. Collocare il DNA chip sul Bioanalyzer e chiudere **delicatamente** il coperchio. A questo punto, l'immagine sullo schermo mostrerà, anziché il Bioanalyzer, un chip rosso DiversiLab. Selezionare **DiversiLab System V1.4** dal menu **Assay** (analisi).

   Avvertenza: il coperchio dell'Agilent® 2100 Bioanalyzer **NON** è dotato di un meccanismo di chiusura. Il coperchio non deve essere aperto nel corso dell'analisi. L'apertura nella fase di analisi terminerà il test. **NON** riporre mai oggetti sopra il Bioanalyzer- Effettuare pressioni sul coperchio potrebbe danneggiare gli elettrodi.
3. Digitare il numero di chip riportato sull'etichetta nella finestra File Prefix (prefisso file).

Nota: è necessario digitare il numero corretto di chip nel campo File Prefix in modo da consentire l'associazione con le informazioni nel software DiversiLab™ relative al campione appropriato. **Run Sample** (Avvia campione) deve essere impostato tra 1 e 12.

4. Fare clic su **Start** (Avvio). L'esame del chip richiederà circa 1 ora.
5. Al termine del processo, i dati vengono trasferiti automaticamente dal pc del Bioanalyzer al DiversiLab software, in cui potranno essere analizzati da qualsiasi PC connesso a Internet.
6. Aprire il coperchio del Bioanalyzer per rimuovere il DNA chip. Riporre il DNA chip in un contenitore per scarti a rischio biologico appropriato.
7. Pulire gli elettrodi del Bioanalyer alla fine di ogni analisi. Pipettare lentamente **350 µL** di acqua deionizzata in un pozzetto del chip per la pulizia degli elettrodi e inserirlo nel Bioanalyzer. Chiudere il coperchio e lasciare in ammollo per 10-15 secondi. Aprire il coperchio e togliere il chip di pulizia. Lasciare gli elettrodi ad asciugarsi per almeno 10-15 secondi prima di caricare altri DNA chip.

Operazione 4: analisi dei risultati

Accedere al software DiversiLab da qualsiasi PC connesso a Internet. Consultare la Guida utente del software DiversiLab per dettagli sulla procedura QC, sulla creazione e sulla visione di rapporti.

Note sulla procedura

Possibili fonti di errore:

- Al fine di assicurare una corretta pressurizzazione dei chip, è importante che la siringa sia attaccata saldamente alla base per il priming dei chip e che la pressione sia applicata per 30 secondi esatti.
- Al fine di assicurare una corretta normalizzazione e dimensionamento dell'immagine gel, è estremamente importante che il ladder e il DNA marker siano ben miscelati prima dell'utilizzo. I DNA marker di150 bp e 7000bp consentono la normalizzazione di ciascun fingerprint. È possibile l'utilizzo del ladder di peso molecolare per la stima del peso dei frammenti.

Manutenzione:

- Prima di ogni utilizzo verificare la presenza di crepe sulla siringa e sullo stantuffo. Qualora si notino difetti, sostituire la siringa.
- Dopo ogni analisi, sciacquare gli elettrodi in acqua deionizzata utilizzando il chip per la pulizia degli elettrodi.
- Applicare ogni tre mesi acqua deionizzata sugli elettrodi, adoperando una spazzola a setole morbide.
- Strofinare periodicamente le superfici esterne del Bioanalyzer per prevenire la formazione di polvere. Utilizzare aria compressa per rimuovere la polvere dall'area di lettura dei chip.
- Non toccare la lente in vetro.

Contatti

Bacterial Barcodes, Inc.
425 River Road
Athens, GA 30602 USA

www.biomerieux.com

Per l'assistenza tecnica negli USA, rivolgersi al bioMérieux Customer Service al numero +1-800-682-2666. Al di fuori degli USA, rivolgersi al rappresentante locale bioMérieux.

Agilent è un marchio registrato di Agilent Technologies, Inc.
bioMérieux, il logo blu e DiversiLab sono marchi utilizzati, in corso di registrazione e/o registrati di proprietà di bioMérieux SA o di una delle sue filiali.
Caliper e LabChip sono marchi registrati di Caliper Life Sciences negli Stati Uniti e/o in altri paesi.

Novembre 2008

DiversiLab LabChip®

Bacterial Barcodes, Inc.
BBCI Catalog Number: DL-CK25
bioMérieux REF 270670

325 回分

日本語

研究用。診断手順には使用しないでください。

キット内容

DNA チップ試薬・付属消耗品　貯法: + 2～+ 8° C

キャップの色	試薬名	容量
黄色	DNA Ladder	30 µL
緑色	DNA Maker（150bp と 7,000bp）	2.0 µL
青色	DNA Dye Concentrate	75 µL
赤色	DNA Gel Matrix	1.4 µL
	スピンフィルタ	6 個

DNA チップ　貯法: + 18～+ 30° C

LabChip®	25 個
電極クリーニングチップ	2 個
シリンジ	2 個

付属していないその他の必要器具

- DiversiLab システム : Agilent 2100 バイオアナライザー（チッププライミングステーション、ボルテックスミキサー、タイマーを含む）
- パウダーフリーグローブ、実験用コート、アイプロテクション
- ピペット：0.1～10µL、10～100µL、100～1000µL、マルチチャンネルまたはリピータピペット（任意）
- エアロゾル耐性バリアピペットチップ：0.1～10 µL、10～100 µL、100～1000 µL
- マイクロ遠心チューブ、1.5 mL
- マイクロ遠心機　可変スピード型
- 脱イオン水

使用目的

LabChip®キットには、DiversiLab システムを用いた自動 DNA 断片分離・検知のための DNA チップ（Caliper®製）と DNA チップ試薬・付属消耗品が入っています。

はじめに

DiversiLab フィンガープリンティングキットを使った微生物ゲノム DNA の増幅は、サイズが 200bp から 2,000bp 余りに及ぶ DNA 断片からなる特徴的 DNA パターンを生成します。Agilent 2100 バイオアナライザーは微小流体技術 LabChip®を使用することにより、従来の電気泳動手順をひとつの自動プロセスにまとめます。DNA サンプルは DNA チップの微小流路内で分離されます。分離された DNA 断片がレーザービームの中を通過すると、電気泳動図の形で DNA 指紋が作成されます。各種サンプルからの指紋は DiversiLab ソフトウェアを使って比較します。

DiversiLab システムの原理

rep-PCR DNA 指紋生成にかかわる主な手順は次のとおりです。

- 精製された微生物培養から DNA を抽出します。
- DiversiLab ソフトウェアにサンプル情報を登録します。
- サーマルサイクラーで rep-PCR 増幅を行います。
- Agilent 2100 バイオアナライザーを使って DNA 断片を分離します。
- DiversiLab ソフトウェアの統計分析機能を使って指紋を比較します。

本書は、DNA の分離と結果の分析にともなう具体的手順を紹介するものです。「DiversiLab ソフトウェアユーザーガイド」と DiversiLab フィンガープリンティングキットの添付書類も併せて参照してください。

使用上の注意

- このキットには所定の検査数に間に合うだけの試薬が用意されています。
  ボックスに印刷された有効期限を過ぎたキットの内容物は使用しないでください。

制限事項

- DiversiLab kit を使って得た結果を所定の用途以外に用いたり、支給されたプロトコルを厳守しないと、結果の有効性／信頼性が損なわれるおそれがあります。

使用上の注意

DNA Dye Concentrate は DMSO を含有しています。DMSO に関係する安全上の注意は MSDS を参照してください。

サンプルの分離と分析

rep-PCR の準備・実行に関係する手順については、該当するキットの添付書類を参照してください。

ステップ 3 *（rep-PCR キットからの続き）*：増幅 DNA の分離

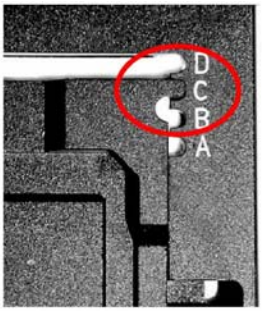
■ Gel-Dye ミックスの準備

1. ボックス（DiversiLab DNA チップ試薬および付属消耗品）の内容物を 30 分**以上**かけて室温まで温めてください。バイオアナライザーはご使用になる 30 分以上前に電源を入れてください。
   - DNA Dye Concentrate (染色液)が光に晒されるのを防ぐため、試薬を温めているときは試薬の箱の蓋を閉じておいてください。
2. DNA Gel Matrix と DNA Dye Concentrate を攪拌します（ボルテックスにかける）。暫時スピンダウンしてください。
3. 1.5 mL のマイクロ遠心チューブに **200 µL** の DNA Gel Matrix（赤色キャップ）と **10 µL** の DNA Dye Concentrate（青色キャップ）を加えます。
   - **注：**DNA Gel Matrix は粘性です。適量を移すためピペットはゆっくりと操作してください。
4. チューブを暫時ボルテックスにかけ（5～10 秒）溶液を均一にします。
5. 付属のスピンフィルタに溶液を移します。室温で 1,500×g の遠心分離を 10 分間行います。7 回分の Gel-Dye ミックスとなります。Gel-Dye ミックス作製日をチューブに記載してください。Gel-Dye ミックスは 4℃で遮光保管すれば 4 週間もちます。

> **注：DNA Dye Concentrate** と Gel-Dye ミックスは遮光してください。光に晒すと染料が劣化するおそれがあります。

■ チップの装填

1. ボックス（DiversiLab DNA チップ試薬および付属消耗品）の内容物を 30 分以上かけて室温まで温めてください。DNA Marker と DNA Ladder を軽くボルテックスにかけ、スピンダウンしてください。試薬が十分に混合していないと検査に支障をきたすおそれがあります。Gel-Dye ミックスはボルテックスにかけないでください。
2. 新品の DNA チップの包装を解き、その背面に指紋や欠陥がないか調べてください。ガラスレンズは素手やグローブで**触らないでください**。指紋に気づいたらレンズペーパーで丁寧に拭きとってください。
3. チップワークシートを参照しながら割り当てられたチップ番号をチップラベルに記入します。
4. ベースプレートを **C の位置**に配置し、DNA チップをチッププライミングステーションに置きます。シリンジはしっかりと取り付け、シリンジクリップは**一番上の位置**に配置してください。シリンジのプランジャは 1.0 mL まで調整してください。



5. リバースピペット法でゲル・染料混合物を **9 µL** とり、チッププライミングウェル G に移します。気泡がある場合は清潔なピペットチップを使って取り除いてください。

   - **注：**気泡を防ぐため、液体をチップに分注するときは必ずウェルの底部にピペットチップを当ててください。

6. チッププライミングステーションの蓋を下げ、銀色の突起を押して蓋を固定します。プランジャをシリンジクリップまで押し下げ、チップを**正確に** 30 秒間加圧します。

7. **正確に** 30 秒間が経過したらシリンジクリップを解放します。プランジャをプランジャ自体の圧力で動きがなくなるまで上昇させます。銀色の突起を上げて蓋の固定を**静かに**解除し、DNA チップを取り除きます。

8. DNA チップ背面の流路に気泡（線状の気泡）がないか調べます。気泡がある流路には注意してください。チップの装填を続けますが、気泡があるとチップに不具合が生じるおそれがあります。

9. リバースピペット法でゲル・染料混合物を **9 µL** とり、2 つの廃棄ウェル(G)に移します。

10. リバースピペット法で十分に混合された DNA Marker を **5 µL** とり、ラダーウェルと 12 個の各サンプルウェルに移します。

- 注 : Mycobacterium と Mycobacterium tuberculosis キットは、キットに含まれる専用 DNA Marker を PCR 産物を接種するウェルに入れてください。

11. リバースピペット法で PCR 産物を 1 µL とり、チップワークシートのウェル割り当てに従いサンプルウェル、ラダーウェルの各々に移します。吹き飛ばさないでください。

- 注 : チップに装填されたサンプルが 12 サンプルに満たない場合は、DNA Marker か同じサンプルを 1 µL とり、未使用ウェルに移してください。

12. レベリングバブルを使ってボルテックスをチェックします。ボルテックスアダプタの中にチップをしっかりと置き、2200 で**正確に** 1 分間ボルテックスにかけます。

13. チップは **5 分以内に**バイオアナライザーに装填してください。

■ Agilent 2100 バイオアナライザーによる DNA チップの測定

- **注 :** バイオアナライザーは必ずご使用になる 30 分**以上**前に電源を入れておいてください。
- **注意 :** 携帯電話の使用、バイオアナライザーへの衝撃、電力サージ、振動面上でのバイオアナライザー配置などはエラーの原因になります。

1. バイオアナライザーソフトウェアは DNA チップをバイオアナライザーに置く前に起動してください。バイオアナライザーとコンピュータが接続され、通信が行われていることを確認してください。

   - 通信が開放しているときには PC の左上の画像にバイオアナライザーを模した図が表示されます。バイオアナライザーの蓋が開くと、ディスプレイ上の画像にも開いた蓋が現れます。

2. バイオアナライザーに DNA チップを置き、蓋を**静かに**閉じます。このときディスプレイ上の画像はバイオアナライザーから赤い DiversiLab LabChip 変わります。**Assay** メニューから **DiversiLab System V1.4** を選択してください。

   - **注意 :** Agilent 2100 バイオアナライザーの蓋にはロックが**ありません**。分析中は蓋を開けないでください。分析中に蓋を開けると解析が中断します。常にバイオアナライザー上には物を**置かないでください**。蓋が圧迫されると電極が破損するおそれがあります。

3. Start ダイアログボックスの File Prefix ウィンドウではチップラベルに記載されたチップ番号を入力してください。

   - **注 :** チップ番号を DiversiLab ソフトウェアのサンプル情報に正しく対応させるため、File Prefix フィールドには正しいチップ番号を入力してください。 Run Sample は必ず 1 から 12 に設定してください。

4. Start をクリックします。チップの処理には約 1 時間かかります。

5. 完了後、データはバイオアナライザーの PC から DiversiLab ソフトウェアへ自動的に転送され、インターネットに接続された PC からデータを分析することができます。このウィンドウは処理情報を伝えるほか、エラーが発生した場合にはエラーも伝えます。

6. バイオアナライザーの蓋を開け、DNA チップを取り出します。DNA チップは適切なバイオハザード用容器に入れて処分してください。

7. 処理が終わったらそのつどバイオアナライザーの電極を掃除します。脱イオン水 350 µL をとり、電極クリーナーチップのウェル 1 個にゆっくりと移し、チップをバイオアナライザーに入れます。蓋を閉じ、10〜15 秒かけて浸します。蓋を開けてクリーナーチップを取り出します。次の DNA チップを装填する前には 10〜15 秒以上かけて電極を乾かしてください。

ステップ 4：結果の分析

インターネットに接続された PC から DiversiLab ソフトウェアにログインします。QC 手順とレポートの作成・閲覧の詳細については「DiversiLab ソフトウェアユーザーガイド」を参照してください。

手順に関する注意事項

エラーの原因：

- チップを正常に加圧するには、チッププライミングステーションにシリンジをしっかりと取り付け、正確に 30 秒間圧力をかけることが重要です。
- ゲル画像の適切な正規化とサイジングのため、DNA Ladder と DNA Marker は使用する前にそのつど十分に混合することがきわめて重要です。150bp と 7,000bp の DNA Marker で各フィンガープリントの正規化が可能です。分子量ラダーは、断片サイズを推定するために使用することがあります。

メンテナンス：

- シリンジとプランジャは使用前にそのつど亀裂の有無を調べてください。シリンジの欠陥に気づいた場合は交換してください。
- 処理の後にはそのつど電極クリーニングチップを使って電極を脱イオン水ですすいでください。
- 電極は、3 ヶ月に一度、脱イオン水と毛先の柔らかいブラシを使って掃除してください。
- バイオアナライザーの外面は埃の堆積を防ぐため定期的に拭いてください。チップ読み取り部の埃は圧縮空気で取り除いてください。
- ガラスレンズには触らないでください。

お問合せ

シスメックス株式会社
CS センター
〒651-2241
神戸市西区室谷 1 丁目 3 番地の 2
TEL　0120-265-034

シスメックス・ビオメリュー株式会社
〒141-0032
東京都品川区大崎一丁目 2 番 2 号
大崎セントラルタワー8 階
TEL　03-6834-2666（代表）

この説明書およびその使用は、米国特許番号 5,523,217 、 5,691,136 にて保護されています。

Agilent は Agilent Technologies Inc が所有し、使用している登録済み商標です。
AmpliTaq および GeneAmp は Applied Biosystems Corporation が米国もしくはまた米国以外の国で使用している登録済み商標です。
Caliper および LabChip は Caliper Life Sciences が米国もしくはまた米国以外の国で使用している登録済み商標です。
DiversiLab bioMérieux, Inc.はの登録商標です。
UltraClean は Mo Bio の登録商標です。

November 2008

Instructions for Use of LabChip® Devices

Bacterial Barcodes, Inc.
Referência de Catálogo BBCI: DL-CK25
bioMérieux REF 270670

Embalagem de 325 testes
PORTUGUÊS

Não se Destina à Utilização em Diagnóstico.

Materiais fornecidos na embalagem

Acessórios e Reagentes de Chips de ADN Armazenar entre: +2 e +8 °C

Cor da Tampa	Nome	Volume
Amarelo	Ladder de ADN	30 µL
Verde	Marcador de ADN (150 pb e 7.000pb)	2,0 mL
Azul	Concentrado de Corante de ADN	75 µL
Vermelho	Matriz do Gel de ADN	1,4 mL
	6 tubos com Filtro	

Chips de ADN Armazenar entre: +18 e +30 °C

25 Dispositivos LabChip®
2 Chips de limpeza de eléctrodos
2 Seringas

Outros materiais necessários, mas não fornecidos

- Sistema DiversiLab™: Agilent® 2100 Bioanalyzer (Inclui a Estação de priming de chips, Misturador de vortex e temporizador)
- Luvas sem pó, bata e protecção ocular
- Pipetas: Pipeta multicanal ou de repetição (opcional) de 0,1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL (opcional)
- Pontas de pipetas com filtro para barreira a aerossóis: 0,1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL
- Tubos de microcentrifugação, 1,5 mL
- Microcentrífuga, velocidade variável
- Água desionizada

Aplicação

A embalagem do dispositivo LabChip® contém os chips de ADN (fabricados pela Caliper®) e os acessórios e reagentes de chips de ADN necessários para a separação e detecção de fragmentos de ADN automatizada utilizando o Sistema DiversiLab.

Introdução

A amplificação de ADN genómico microbiano com as embalagens de fingerprinting da DiversiLab produz um padrão de ADN característico, composto por fragmentos de ADN, variando em termos de tamanho entre 200 pb e 2.000 pb. O Agilent® 2100 Bioanalyzer utiliza a tecnologia microfluídica LabChip® para integrar as etapas individuais da electroforese convencional num único processo automatizado. As amostras de ADN são separadas dentro de micro-canais do chip de ADN. À medida que os fragmentos de ADN separados atravessam o feixe de laser, é gerado um fingerprint de ADN, sob forma de um electroferograma. São comparados os fingerprints de várias amostras utilizando o software DiversiLab.

Princípio do Sistema DiversiLab

As principais etapas envolvidas na criação de fingerprintings de ADN por rep-PCR são descritas em seguida:

- Extrair o ADN de culturas puras microbianas.
- Registar as informações das amostras no software DiversiLab.
- Realizar uma amplificação por rep-PCR num termociclador.
- Separar os fragmentos de ADN utilizando o Agilent® 2100 Bioanalyzer.
- Comparar os fingerprintings utilizando a funcionalidade de análise estatística do software DiversiLab.

Este documento fornece o procedimento específico associado à separação de ADN e à análise dos resultados. Consultar também o Guia do Utilizador do Software DiversiLab e o folheto da embalagem de fingerprinting da DiversiLab.

Instruções de utilização

- Esta embalagem contém reagentes suficientes para o número de testes indicado.
- Não utilizar os componentes desta embalagem após a data de validade impressa na caixa.

Limitações do teste

- Os resultados obtidos a partir da utilização da embalagem DiversiLab™ poderão não ser úteis ou fiáveis, caso o protocolo fornecido não seja seguido de forma exacta ou se os resultados forem utilizados numa aplicação para a qual não eram destinados.
- Este produto não se destina a ser utilizado em diagnóstico e os resultados deste teste não devem ser utilizados no diagnóstico de doenças ou para curar, mitigar, tratar ou prevenir a ocorrência de uma doença num doente.

Precauções

- O concentrado de corante de ADN contém DMSO. Consultar as fichas de dados de segurança dos materiais (MSDS) quanto às precauções relativas ao DMSO.
- S24/25: Evitar o contacto com a pele e com os olhos.

Separação e análise das amostras

Consultar o folheto da respectiva embalagem quanto aos procedimentos relativos à configuração e desempenho do rep-PCR.

Etapa 3 (continuação das instruções da embalagem do rep-PCR)**: Separar ADN amplificado**

■ Preparar a mistura de gel e corante

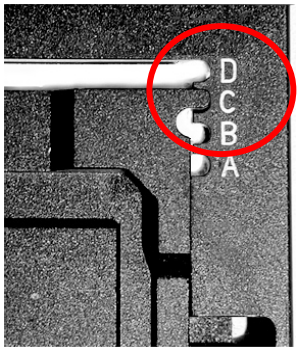
1. Aguardar até o conteúdo da caixa de Acessórios e reagentes de chips de ADN da DiversiLab aquecer até à temperatura ambiente durante, **pelo menos**, 30 minutos. Ligar o Bioanalyzer, pelo menos, 30 minutos antes da sua utilização.
   - Durante o tempo de aquecimento, manter a tampa da caixa de reagentes fechada para impedir a exposição do corante à luz.
2. Colocar a matriz do gel de ADN e o concentrado de corante de ADN no vórtex. Centrifugar brevemente.
3. Adicionar **200 µL** de matriz do gel de ADN (tampa vermelha) e **10 µL** de concentrado de corante de ADN (tampa azul) num tubo de microcentrifugação de 1,5 mL.

   Nota: A matriz do gel de ADN é viscosa. Pipetar lentamente para assegurar a transferência do volume apropriado.
4. Colocar o tubo no vórtex por breves momentos (5-10 segundos) até a solução se apresentar homogénea.
5. Transferir a solução para um tubo com filtro fornecido. Centrifugar a 1,500 x g durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Deverá existir uma mistura de gel e corante suficiente para 7 preparações. Anotar a data no tubo de mistura de gel e corante. Quando conservada a 4 ºC e ao abrigo da luz, a validade da mistura de gel e corante é de 4 semanas.

Nota: Proteger o concentrado de corante e a mistura de gel e corante da luz. A exposição à luz poderá causar a degradação do corante.

■ Carregar o chip

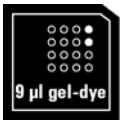
1. Aguardar até o conteúdo da caixa de Acessórios e reagentes de chips de ADN aquecer até à temperatura ambiente durante, pelo menos, 30 minutos. Colocar brevemente no vórtex, e processar por meio de centrifugação breve o marcador e a ladder de ADN. Se os reagentes não forem suficientemente misturados, o teste poderá falhar. Não colocar a mistura de gel e corante no vórtex.
2. Desembalar um chip de ADN novo e inspeccionar o verso quanto a fingerprints ou defeitos. **NÃO** tocar na lente de vidro com as mãos desprotegidas ou com luvas. Caso sejam detectadas impressões, remover suavemente com papel próprio para lentes.
3. Consultando a folha de trabalho do chip, anotar o número atribuído ao chip no rótulo do mesmo.
4. Colocar o chip de ADN na estação de priming de chips, com a placa base na **posição C**. A seringa deverá estar firmemente fixa e o clipe da seringa deverá situar-se na **posição cimeira**. Ajustar o êmbolo da seringa para 1,0 mL.



5. Recorrendo a uma técnica de pipetagem reversa, pipetar **9 µL** de mistura de gel e corante no poço de priming de chips G. Remover quaisquer bolhas de ar com uma ponta de pipeta limpa.

Nota: Para impedir a formação de bolhas de ar, colocar sempre a ponta da pipeta no fundo do poço quando proceder à distribuição do líquido no chip.

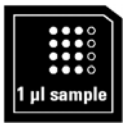
6. Baixar a tampa da estação de priming de chips e proceder ao seu fecho, premindo a aba prateada. Pressionar o êmbolo até ao clipe da seringa e permitir a pressurização do chip durante **exactamente** 30 segundos.
7. Após **exactamente** 30 segundos, soltar o clipe da seringa. Permitir que o êmbolo regresse à posição original com base na sua própria pressão, até o movimento parar. Com cuidado, desbloquear a tampa, levantando a aba prateada e retirar o chip de ADN.
8. Inspeccionar o verso do chip de ADN quanto à formação de bolhas de ar nos canais (as bolhas aparecem sob forma de linhas). Verificar se algum dos canais contém bolhas. Continuar a carregar o chip; contudo, caso ocorra a formação de bolhas poderá verificar-se a falha do chip.
9. Recorrendo a uma técnica de pipetagem reversa, pipetar **9 µL** de mistura de gel e corante nos dois poços de resíduos G.



10. Recorrendo a uma técnica de pipetagem reversa, pipetar **5 µL** de Marcador de ADN bem misturado no poça da ladder e em cada um dos doze poços de amostras.

Nota: As embalagens de *Mycobacterium* e *M. tuberculosis* da DiversiLab contêm um marcador específico da embalagem. Utilizar esse marcador apenas em poços que contenham amplicões derivados dessas embalagens, para assegurar uma quantidade de reagente suficiente.

11. Recorrendo a uma técnica de pipetagem inversa, pipetar **1 µL** de produto de PCR em cada um dos poços de amostras, incluindo o poço da ladder, observando as atribuições dos poços existentes na folha de trabalho do chip.



Nota: Se forem carregadas menos de 12 amostras num chip, pipetar uma amostra em duplicado em cada um dos poços não utilizados.

12. Verificar o vórtex com um nível de bolha de ar. Colocar o chip de forma segura no adaptador do vórtex e accionar durante **exactamente** 1 minuto, a uma velocidade de 2200.
13. O chip tem de ser carregado no Bioanalyzer **num espaço de 5 minutos**.

■ Processar o chip de ADN no Agilent® 2100 Bioanalyzer

Nota: Certificar-se de que o Bioanalyzer foi ligado, **pelo menos**, 30 minutos antes da sua utilização.

Cuidado: Podem ocorrer erros causados pela utilização de telemóveis, choques do Bioanalyzer, picos de corrente ou devido à colocação do Bioanalyzer sobre uma superfície sujeita a vibrações.

1. Iniciar o software do Bioanalyzer, antes de colocar o chip de ADN no Bioanalyzer. Certificar-se de que o Bioanalyzer e o computador estão ligados e a comunicar.
   - A imagem no canto superior esquerdo do PC irá apresentar uma imagem semelhante ao Bioanalyzer quando este se encontra em comunicação. Quando a tampa do Bioanalyzer está aberta, a imagem apresentada também aparenta ter uma tampa aberta.

2. Colocar o chip de ADN no Bioanalyzer e fechar **cuidadosamente** a tampa. Agora, a imagem apresentada deverá mudar de um Bioanalyzer para um chip DiversiLab vermelho. Seleccionar **DiversiLab System V1.4** no menu de **Ensaios**.

   Cuidado: A tampa do Agilent® 2100 Bioanalyzer **NÃO** dispõe de um mecanismo de bloqueio. A tampa não pode ser aberta durante a análise. A abertura da tampa durante a análise interromperá o teste. **NÃO** colocar nada sobre o Bioanalyzer em circunstância alguma. A pressão sobre a tampa poderá danificar os eléctrodos.

3. Digitar o número do chip, existente no rótulo do chip, na janela Prefixo de ficheiro.

   Nota: É necessário introduzir o número de chip correcto no campo Prefixo de ficheiro, para que este seja associado à informação de amostra correcta no software DiversiLab™. A função **Processar Amostra** tem de ser definida entre 1 e 12.

4. Clicar em **Iniciar**. O processamento do chip demora aproximadamente 1 hora.
5. Após a conclusão, os dados são automaticamente transferidos do PC do Bioanalyzer para o software DiversiLab, onde poderão ser analisados a partir de qualquer PC com ligação à Internet.
6. Abrir a tampa do Bioanalyzer e retirar o chip de ADN. Eliminar o chip de ADN num recipiente para materiais de risco biológico.
7. Após cada processamento, limpar os eléctrodos do Bioanalyzer. Pipetar lentamente **350 µL** de água desionizada num poço do chip de limpeza de eléctrodos e colocá-lo no Bioanalyzer. Fechar a tampa e deixar de molho durante 10-15 segundos. Abrir a tampa e retirar o chip de limpeza. Deixar os eléctrodos secarem ao ar durante, pelo menos, 10-15 segundos antes de carregar o chip de ADN seguinte.

Etapa 4: Analisar os resultados

Iniciar sessão no software DiversiLab a partir de qualquer PC com ligação à Internet. Consultar o Guia do Utilizador do Software DiversiLab para obter os detalhes sobre o procedimento de CQ e sobre como criar e visualizar relatórios.

Notas de procedimento

Possíveis origens de erro:

- Para uma pressurização adequada do chip, é importante que a seringa esteja firmemente fixa à estação de priming de chips e que a pressão seja aplicada durante exactamente 30 segundos.
- Para a normalização e calibração adequadas da imagem do gel, é extremamente importante que a ladder e o marcador de ADN sejam bem misturados antes de cada utilização. Os marcadores de ADN de 150 pb e 7.000 pb permitem a normalização de cada fingerprint. O peso molecular da ladder poderá ser utilizada para efectuar a estimativa do tamanho dos fragmentos.

Manutenção:

- Antes de cada utilização, inspeccionar a seringa e o êmbolo quanto a fissuras. Caso sejam detectados quaisquer defeitos, substituir a seringa.
- Enxaguar os eléctrodos em água desionizada, utilizando o Chip de limpeza de eléctrodos, após cada processamento.
- De três em três meses, escovar os eléctrodos com água desionizada e uma escova com cerdas macias.
- Limpar periodicamente as superfícies exteriores do Bioanalyzer para evitar a acumulação de pó. Utilizar ar comprimido para remover o pó da área de leitura do chip.
- Evitar tocar na lente de vidro.

Informações de contacto

Bacterial Barcodes, Inc.
425 River Road
Athens, GA 30602 USA

www.biomerieux.com

Para obter assistência técnica nos EUA, contactar o Serviço de Atendimento ao Cliente da bioMérieux, através do telefone +1-800-682-2666. Fora dos EUA, contactar o representante local da bioMérieux.

Agilent é uma marca comercial registada da Agilent Technologies, Inc.
bioMérieux, o logótipo azul e DiversiLab consistem em marcas comerciais utilizadas, pendentes e/ou registadas pertencentes à bioMérieux SA ou a uma das suas subsidiárias.
Caliper e LabChip são marcas comerciais registadas da Caliper Life Sciences nos Estados Unidos e/ou noutros países.

Novembro de 2008